

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2 5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day month year) 11 July 2001 (11.07.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/06527	<b>Applicant's or agent's file reference</b> PH-997-PCT
<b>International filing date</b> (day month year) 22 September 2000 (22.09.00)	<b>Priority date</b> (day month year) 06 October 1999 (06.10.99)
<b>Applicant</b> KUROSAWA, Keiko et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
26 April 2001 (26.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



37  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-997-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No. PCT/JP00/06527	International filing date ( <i>day month year</i> ) 22 September 2000 (22.09.00)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 06 October 1999 (06.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/00		
Applicant KIKKOMAN CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26 April 2001 (26.04.01)	Date of completion of this report 30 August 2001 (30.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP00/06527

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06527

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement			YES
Novelty (N)	Claims	1-11	NO
	Claims		
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### Claims 1-8

Document 1 [EP, 825257, A2 (Kikkoman Corp.) 25 February 1998 (25.02.98)] cited in the international search report describes the isolation and purification of the protein capable of regenerating luciferin using the oxyluciferin and D-cysteine set forth as the inventions in Claims 1-8. In light of the level of technology in this field prior to the priority date of this application, if a protein could be isolated and purified, then determining its amino acid sequence, using the DNA that codes for part of that amino acid sequence as a probe, cloning cDNA that codes for that protein from a cDNA library, and determining the DNA sequence were widely known conventional procedures. Furthermore, a firefly is the origin of both the protein described in document 1 and of the protein coded for by the gene set forth as Claims 1-8, and therefore, persons skilled in the art could easily conceive of applying widely known techniques to obtain DNA that codes for the protein described in document 1. As a result, the inventions set forth as Claims 1-8 do not appear to involve an inventive step.

#### Claims 9-11

If a gene that codes for a protein can be cloned, then it is a conventional procedure in the field of genetic engineering to prepare a vector containing that gene, introduce the vector into a host, obtain a transformant, and produce the protein. This examination finds no particularly outstanding technical feature in the inventions set forth as Claims 9-11, and therefore the inventions in these Claims do not appear to involve an inventive step.





## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PH-997-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06527	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 06.10.99
出願人(氏名又は名称) キッコーマン株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12Q1/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
BISIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 825257, A2 (KIKKOMAN CORP) 25日. 2月. 1998 (25. 02. 98) & US, 5814504, A & JP, 10-114794, A	1-11
A	Microbiology, (1998) Vol. 144, p. 1593-1600, Anil Wipat et al. "The yvsA-yvqA region of the Bacillus subtilis chromosome containing genes involved in metal ion uptake and a putative sigma factor"	1-11
A	WO, 92/04468, A (PROMEGA CORP) 19日. 3月. 1992 (19. 03. 92) & EP, 553234, A1 & US, 5283179, A & JP, 6-500921, A	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





## PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/25426  
PCT/JP00/06527

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HIRAKI, Yusuke  
Toranomon No. 5 Mori Building, 3rd  
floor  
17-1, Toranomon 1-chome  
Minato-ku, Tokyo 105-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 April 2001 (12.04.01)		
Applicant's or agent's file reference PH-997-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/06527	International filing date (day/month/year) 22 September 2000 (22.09.00)	
Priority date (day/month/year) 06 October 1999 (06.10.99)		
Applicant KIKKOMAN CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 12 April 2001 (12.04.01) under No. WO 01/25426

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年4月12日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/25426 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/00 [JP/JP]; 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06527 (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年9月22日 (22.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ: 特願平11/285258 1999年10月6日 (06.10.1999) JP 添付公開書類: 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 Chiba (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒澤恵子 (KUROSAWA, Keiko) [JP/JP]. 梶山直樹 (KAJIYAMA, Naoki)

(54) Title: GENE ENCODING PROTEIN CAPABLE OF REGENERATING LUCIFERIN, NOVEL RECOMBINANT DNA AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN CAPABLE OF REGENERATING LUCIFERIN

(54) 発明の名称: ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、新規な組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法

(57) Abstract: A gene encoding a protein which is capable of acting on oxyluciferin and D-cysteine and thus regenerating luciferin; the above gene originating in a luminous organism; a protein encoded by the above gene; and a process for producing a protein capable of regenerating luciferin characterized by comprising culturing a transformant or a transductant having the above gene transferred therein and collecting the protein capable of regenerating luciferin from the culture. Thus, the protein capable of regenerating luciferin can be efficiently produced, which brings about a great industrial advantage.

/続葉有/

WO 01/25426 A1



---

(57) 要約:

オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、発光能力を有する生体由来の上記の遺伝子、上記遺伝子によりコードされるタンパク質、そして、上記の遺伝子を導入した形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法である。

本発明によれば、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。



## 明 細 書

ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、新規な組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法

## 技術分野

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、新規な組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法に関する。

## 背景技術

ルシフェリンは、生物発光酵素ルシフェラーゼの基質であり、ルシフェラーゼによる発光後オキシルシフェリンに変換される。ルシフェラーゼを用いたATP測定法は、医療や食品衛生分野で広く使われているが、基質として用いられるルシフェリンが高価であること、また、ルシフェラーゼ反応が反応後生成されるオキシルシフェリンにより阻害されることから、オキシルシフェリンの除去、またはルシフェリンへの再生がルシフェラーゼATP測定法の発展をさらに進めるものと考えられる。オキシルシフェリンをルシフェリンに再生することのできるホタル由来のタンパク質が見い出されている（U. S. Pat. No. 5814504）が、ホタル体内からは、微量にしか抽出できず、工業的な利用は困難であった。

ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系に添加すれば、発光を持続させることができ、また使用するルシフェラーゼ及びルシフェリンの使用量を軽減させることができる。

## 発明の開示

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を挿入した組み換え体DNAを用い、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法を提供することを目的とする。

そこで、本発明者等は、上記目的に鑑み鋭意検討を行なった結果、甲虫類に属

する昆虫由来のルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を単離し、その遺伝子の構造を決定し、更にまた、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得ることに成功した。次いで、この組み換え体DNAを宿主細胞に含ませた形質転換体または形質導入体を培養すると、効率よくルシフェリン再生能力を有するタンパク質が生産されること等を見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明の第1の発明は、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子である。

本発明の第2の発明は、発光能力を有する生体由来の上記の遺伝子である。

本発明の第3の発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質

本発明の第4の発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子である。

本発明の第5の発明は、上記のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAである。

本発明の第6の発明は、上記組み換え体DNAを含む形質転換体または形質導入体である。

本発明の第7の発明は、上記の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、甲虫類より得られる。

本発明のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、例えば、次のようにして得ることができる。

先ず、アメリカホタル発光器より mRNA を抽出する。

次いで、精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、アメリカホタルのコドン使用頻度を考慮して、合成 DNA を作製し、上記で得られた mRNA を鋳型として、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（以下、RT-PCR 法と略称する。）を行ない、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質の一部をコードする DNA を得る。

上記で得られた mRNA より逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、そのまま、または PCR 法を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を増幅した後、常法に従いベクター DNA に組み込む。用いられるベクター DNA としては、例えば、pUC19（宝酒造社製）、pBR322（宝酒造社製）、pBluescript SK+（Stratagene 社製）、pMAL-C2（NEW England Labs 社製）等のプラスミド DNA、 $\lambda$ ENBL3（Stratagene 社製）、 $\lambda$ DASH II（フナコシ社製）等のバクテリオファージ DNA 等が挙げられる。得られた組み換え体 DNA を用いて、例えば、大腸菌 K-12、好ましくは大腸菌 JM109（東洋紡社製）、DH5 $\alpha$ （東洋紡社製）、XL1-Blue（フナコシ社製）等を形質転換または形質導入して夫々の形質転換体または形質導入体を得る。宿主細胞としては、上記以外に、例えば、大腸菌 K-12 以外の大腸菌等の細菌、酵母、かび、放線菌、蚕、動物細胞等が用いられる。

この形質転換は、例えば、D.M.Morrison の方法（Method in Enzymology, 68, 326-331, 1979）により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B.Hohn の方法（Method in Enzymology, 68, 299-309, 1979）により行なうことができる。

上記形質転換体または形質導入体より純化された新規な組み換え体 DNA を得るには、例えば、P.Guerry 等の方法〔J.Bacteriology, 第 116 巻、第 1064～1066 頁(1973 年)〕、D.B.Clewell の方法〔J.Bacteriology, 第 110 巻、第 667～676 頁(1972 年)〕等により得ることができる。

更に、上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を含

有するDNAを用いて、後述の実施例項目(9)に示す373ADNAシーケンス・システム（パーキンエルマー社製）を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の全塩基配列の解析を行ない（配列番号1参照）、次いで、前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸の一次配列を確定する。（配列番号2参照）

なお、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数、好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列からなるルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、全て本発明に含まれる。

また、配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、全て本発明に含まれる。

そして、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列からなるルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を得るには、如何なる方法でもよく、例えば、遺伝子に点変異または欠失変異を生じさせるための周知技術である部位特定変異誘導法、遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去または付加し、遺伝子を連結する方法、オリゴヌクレオチド変異誘導法等が挙げられる。

上記のようにして得られたルシフェリン再生能力を有する形質転換体または形質導入体、例えば、エッシェリシア属に属する菌株を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質を生産するには、下記のようにして行なうことができる。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

また、上記微生物を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステイブプリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられ

る。

なお、培地の初発 pH は、7～9 に調整するのが適当である。また培養は、30～42℃、好ましくは 37℃ 前後で 6～24 時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。

培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体からルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチーム等の細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトン X-100 等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取するのが好ましい。

このようにして得られた粗ルシフェリン再生能力を有するタンパク質液からルシフェリン再生能力を有するタンパク質を単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせて行なうのが好ましい。

得られたルシフェリン再生能力を有するタンパク質は、オキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生することができる。

(ルシフェリン再生能力測定法)

(試薬)

- A 0.1mM オキシルシフェリン
- B 0.01mM D-システイン
- C 25mM グリシルグリシン+5.4mM 硫酸マグネシウム
- D 10mM ATP (pH7.8)
- E 5mg/ml ルシフェラーゼ

(手順)

- 1 下記反応混液を調製する。

0.005ml A

0.010ml B

0.085ml C

2 タンパク質溶液 0.01ml を添加し、37℃で一定時間反応させる。

3 反応液 0.01ml と C 0.1ml を混合する。

4 下記ルシフェラーゼ混液を調整する。

10ml D

1ml E

5 項目 3 の混合液に項目 4 の混液を 0.1ml 添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例 1〕

(1) アメリカホタル mRNA の調製

アメリカホタル尾部（シグマ社製）10 g を乳鉢と乳棒を用いて粉碎したものを、RNA 抽出試薬 ISOGEN（和光純薬社製）10ml に懸濁し、2700 r.p.m. で 5 分間遠心分離することにより RNA 画分を得た。これより、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1989) 記載の方法に従い、mRNA 0.51mg を得た。

(2) プライマーの合成

項目(1)により精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質約 10  $\mu$ g をプロテインシーケンサー（パーキンエルマー社製）に供し、N 末端アミノ酸配列

を決定した。また、項目(1)により精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質約 10  $\mu$ g をトリプシン消化し、HPLC で分取したペプチド 6 個をプロテインシーケンサーに供し、内部アミノ酸配列を決定した。更に、アメリカホタルのコドン使用頻度を検討した。これらの情報により配列番号 3 及び 4 に記載したプライマーをアマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社のカスタム受託

合成により合成した。

### (3) RT-PCR

反応液を以下の組成で調製し、42℃で 30 分逆転写反応を行なった後、99℃で 5 分間変性させ、5℃で保存した。

#### (反応組成液)

塩化マグネシウム	5mM
*10xRNA PCR バッファー	2 $\mu$ l
水	8.5 $\mu$ l
dNTP	各 1mM
RNase インヒビター	1U/ $\mu$ l
*AMV 逆転写酵素 XL	0.25U/ $\mu$ l
*oligo dT アダプタープライマー	0.125 $\mu$ M
mRNA	1 $\mu$ g

#### \*宝酒造社製

次いで、下記の組成で調製した反応液 80  $\mu$  l を逆転写を行なったチューブに添加し、変性を 94℃で 30 秒間、アニールを 62℃で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1.5 分間で 30 サイクルの反応条件で PCR を行なった。

#### (反応液組成)

プライマー (配列番号 3)	0.2 $\mu$ M
プライマー (配列番号 4)	0.2 $\mu$ M
*10xRNA PCR バッファー	8 $\mu$ l
塩化マグネシウム	2.5mM
*Taq ポリメラーゼ	2.5 ユニット
水	最終容量 80 $\mu$ l になるよう加える。

#### \*宝酒造社製

PCR 終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約 0.75kb に目的の断片と思われるバンドが確認されたので、そのバンドを切り出し、GENECLEAN II (BIO 101 社製) にて精製した。

### (4) 精製した DNA 断片の塩基配列の決定及び解析

精製したDNA断片を 373ADNAシーケンシス・システム（パーキンエルマー社製）を用いて塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列(His Glu Thr Gln Thr Leu Tyr Phe Val Asp Thr)が確認された。このことより、上記の RT-PCR で増幅した DNA断片にはルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の一部の配列が存在していることが確認された。

(5) 3' RACEによる下流領域の解析

先ず、上記のDNA配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマシアバイオテク社により合成した（配列番号5）。これと上記のmRNAと 3'-Full RACE CoreSet（宝酒造社製）を用いて RT-PCR を行ない、3' 未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 650 bp のDNA断片を RecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、DNAシーケンサーで塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列の 5' 領域に上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の部分配列の 3' 配列と同じ配列を含むことが確認された。また、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列 (Ile Pro Asp Pro Gln Val Thr Ser Val Ala Phe Gly Gly Pro Asn Leu Asp Glu) が確認された。

(6) 5' RACEによる上流領域の解析

先ず、上記のDNA配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマシアバイオテク社により合成した（配列番号6～9）。これと上記のmRNAと 5'-Full RACE CoreSet（宝酒造社製）を用いて RT-PCR を行ない、5' 未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 400 bp のDNA断片を RecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、DNAシーケンサーで塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列に上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の部分配列と同じ配列を含むことが確認された。また、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列 (Gly Pro Val Val Glu Lys Ile Ala Glu Leu Gly Lys) が確認された。

(7) RT-PCR による遺伝子断片の取得

上記3つの塩基配列より、翻訳開始コドンと終止コドンを推定し、N末領域と



C末領域のプライマーDNAをアマシャム・ファルマシア・バイオテック社により合成した（配列番号 10 及び 11）。これらと上記 mRNA より RT-PCR を行ない、反応液をアガロース電気泳動で解析した。その結果、約 900 bp のバンドが確認された。このバンドに含まれる DNA 断片を RecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、更に制限酵素 EcoRI 及び PstI（いずれも宝酒造社製）で消化した。一方、プラスミド pKK223-3（ファルマシア社製）を制限酵素 EcoRI 及び PstI で消化後、アガロース電気泳動により精製し、上記精製抽出した DNA 断片とライゲーション反応を行ない、大腸菌 JM109（東洋紡社製）を形質転換した。該形質転換株、即ち、大腸菌 JM109(pLRE)は、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM-BP-6908 として寄託されている。

#### (8) 活性の確認

大腸菌 JM109(pLRE)菌体を、50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む TY 培地（1% バクトトリプトン、0.5% バクトイースト・エキストラクト、0.5% NaCl、pH7.0）10ml にて 37°C でクレット 100 まで振とう培養した後、IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し、更に 4 時間培養した。この培養液を氷上で冷却下、超音波破碎器(Ultrasonic generator、Nissei 社製)を用いて 20 秒 4 回処理した。これをエッペンドルフチューブに入れ、微量遠心機を用い、12,000r.p.m. で 10 分間遠心分離し、上清画分及び沈殿画分に分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移しかえ、前述した酵素活性測定法によりルシフェリン再生能力を測定したところ、ベクターのみを含む大腸菌は、0.94 kcount/ml であるのに対し、大腸菌 JM109(pLRE)は、10.58 kcount/ml とルシフェリン再生能力を有していた。

#### (9) ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の解析

大腸菌 JM109(pLRE)のルシフェリン再生能力が確認されたので、pLRE の挿入断片がルシフェリン再生能力を有するタンパク質の遺伝子を含むことが明らかとなった。そこで、このプラスミド DNA について 373ADNA シークエンス・システム（パーキンエルマー社製）を用いて塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列を配列番号 1 に、また、該 DNA 配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 2 に夫々示した。ルシフェリン再生能力を有するタンパク質の遺伝子は、924bp のコーディング領域を有し、308 個のアミノ酸をコードして

いた。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. オキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子。
2. 発光能力を有する生体由来の請求項 1 記載の遺伝子。
3. 発光能力を有する生体が、甲虫類である請求項 2 記載の遺伝子。
4. 発光能力を有する生体が、ホタルである請求項 2 記載の遺伝子。
5. 発光能力を有する生体が、北米産ホタルである請求項 2 記載の遺伝子。
6. 発光能力を有する生体が、アメリカホタルである請求項 2 記載の遺伝子。
7. 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。
  - (a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
  - (b) アミノ酸配列(a)において、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質
8. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と 50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子。
9. 請求項 1～8 記載のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクター DNA に挿入したことを特徴とする新規な組み換え体 DNA。
10. 請求項 9 記載の組み換え体 DNA を含む形質転換体または形質導入体。
11. 請求項 10 記載の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> A gene coding protein having the ability to regenerate luciferin,  
novel recombinant DNA, process for the preparation of protein having  
the ability to regenerate luciferin

<130> PH-997-PCT

<140>

<141>

<150> JP 11-285258

<151> 1999-10-06

<160> 11

<210> 1

<211> 924

<212> DNA

<213> Photinus pyralis

<400> 1

acactgggatc atgaaactca gaccttataat ttctgtcgaca ccgtagagaa aacttttcat 120

aaatatgtac ctcttcagaa aaaatacacg ttttgtaaag tagataaact ggtttctttc 180



attattcccc ttgctggatc ccttggecgt tttgtagtca gtttgggaacg tgaaatagcc 240  
attctttacat gggatggcgt tagtgctgca cctacaagca tagaagctat tgttaatgtc 300  
gaaccacaca ttaaaaaataa cagactcaat gatggcaaag cagatccccct tggcaatcta 360  
tggacaggta caatggctat tgacgtcgtt cccccgtag gaccggtcac tggcagttta 420  
tatcatttag gggctgataa aaaggtaaaa atgcacgaga gcaacatagc tatagcaaat 480  
gggctcgcgt ggagtaatga ttgaagaaa atgtattata ttgattcggg gaaaagaaga 540  
gtagacgagt acgattatga tgcttctaca ttatccatca gcaatcaacg gccattatit 600  
acttttgaaa agcatgaagt gcctggatat ccagatggtc aaacaattga tgaggagggt 660  
aatttatggg ttgccgtttt ccaaggacag cgaattatta aaatcagtac ccaacaaccg 720  
gaagtgttac tggataccgt aaaaatacca gatcctcagg tcacctctgt agcatttggc 780  
ggtcggaatt tggatgaact gcatgtaaca tctgctggtc ttacagctiga cgacagtict 840  
ttngacaaaa gtttagttaa tgggcacgtc tacagagtaa caggttttagg cgicaaaggt 900  
ttcgcgggag ttaaagtga gcta 924

<210> 2

<211> 308

<212> PRT





&lt;213&gt; Photinus pyralis

&lt;400&gt; 2

Met Gly Pro Val Val Glu Lys Ile Ala Glu Leu Gly Lys Tyr Thr Val  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Gly Pro His Trp Asp His Glu Thr Gln Thr Leu Tyr Phe Val  
 20 25 30  
 Asp Thr Val Glu Lys Thr Phe His Lys Tyr Val Pro Ser Gln Lys Lys  
 35 40 45  
 Tyr Thr Phe Cys Lys Val Asp Lys Leu Val Ser Phe Ile Ile Pro Leu  
 50 55 60  
 Ala Gly Ser Pro Gly Arg Phe Val Val Ser Leu Glu Arg Glu Ile Ala  
 65 70 75 80  
 Ile Leu Thr Trp Asp Gly Val Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ile Glu Ala  
 85 90 95  
 Ile Val Asn Val Glu Pro His Ile Lys Asn Asn Arg Leu Asn Asp Gly  
 100 105 110  
 Lys Ala Asp Pro Leu Gly Asn Leu Trp Thr Gly Thr Met Ala Ile Asp  
 115 120 125  
 Ala Gly Leu Pro Val Gly Pro Val Thr Gly Ser Leu Tyr His Leu Gly  
 130 135 140  
 Ala Asp Lys Lys Val Lys Met His Glu Ser Asn Ile Ala Ile Ala Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Ala Trp Ser Asn Asp Leu Lys Lys Met Tyr Tyr Ile Asp Ser  
 165 170 175  
 Gly Lys Arg Arg Val Asp Glu Tyr Asp Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ser  
 180 185 190  
 Ile Ser Asn Gln Arg Pro Leu Phe Thr Phe Glu Lys His Glu Val Pro  
 195 200 205  
 Gly Tyr Pro Asp Gly Gln Thr Ile Asp Glu Glu Gly Asn Leu Trp Val



210 215 220  
Ala Val Phe Gln Gly Gln Arg Ile Ile Lys Ile Ser Thr Gln Gln Pro  
225 230 235 240  
Glu Val Leu Leu Asp Thr Val Lys Ile Pro Asp Pro Gln Val Thr Ser  
245 250 255  
Val Ala Phe Gly Gly Pro Asn Leu Asp Glu Leu His Val Thr Ser Ala  
260 265 270  
Gly Leu Gln Leu Asp Asp Ser Ser Leu Asp Lys Ser Leu Val Asn Gly  
275 280 285  
His Val Tyr Arg Val Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Phe Ala Gly Val  
290 295 300  
Lys Val Lys Leu  
308

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gttggagaag gaccgatttg ggat 24

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcatccaagt tggggccgcc aaacgcgac 29

<210> 5



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggacaggtac aatggctatt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

atcg tactcg tctactcttc 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

taggtgcagc actaacgcca tc 22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttcacgttcc aaactgacta c 21

<210> 9

<211> 23



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ctcgcggtgga gtaatgattt gaa 23

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ggaattcatg gggccagttg ttgaaaaaat tgc 33

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

aactgcagtc atagcttcac tttaactccc gcgaa 35





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06527

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12Q1/66

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
BISIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 825257, A2 (KIKKOMAN CORP), 25 February, 1998 (25.02.98) & US, 5814504, A & JP, 10-114794, A	1-11
A	Anil Wipat et al., "The yvsA-yvqA region of the Bacillus subtilis chromosome containing genes involved in metal ion uptake and a putative sigma factor", Microbiology, (1998) Vol.144, pp.1593-1600,	1-11
A	WO, 92/04468, A (PROMEGA CORP), 19 March, 1992 (19.03.92) & EP, 553234, A1 & US, 5283179, A & JP, 6-500921, A	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 December, 2000 (19.12.00)

Date of mailing of the international search report  
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12Q1/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

BISIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 825257, A2 (KIKKOMAN CORP) 25日. 2月. 1998 (25. 02. 98) & US, 5814504, A & JP, 10-114794, A	1-11
A	Microbiology, (1998) Vol. 144, p. 1593-1600, Anil Wipat et al. "The yvsA-yvqA region of the Bacillus subtilis chromosome containing genes involved in metal ion uptake and a putative sigma factor"	1-11
A	WO, 92/04468, A (PROMEGA CORP) 19日. 3月. 1992 (19. 03. 92) & EP, 553234, A1 & US, 5283179, A & JP, 6-500921, A	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



137

特 許 協 力 条 約

PCT

REC'D 18 SEP 2001

WIPO PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 PH-997-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06527	国際出願日 (日.月.年) 22.09.00	優先日 (日.月.年) 06.10.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00		
出願人(氏名又は名称) キッコーマン株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 26.04.01	国際予備審査報告を作成した日 30.08.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4N 8114



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-11

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-11

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-11

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1~8について

国際調査報告で引用した文献1(EP, 825257, A2(KIKKOMAN CORP) 25日, 2月, 1998(25.02.98))には、請求の範囲1-8に記載のオキシシルフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質が単離、精製されている。本願優先日前の当該技術分野の技術水準からみて、タンパク質が単離精製されれば、そのアミノ酸配列を決定し、更にそのアミノ酸配列の一部をコードするDNAをプローブとしてcDNAライブラリからそのタンパク質をコードするcDNAをクローニングし、そのDNA配列も決定することは、周知慣用手段である。そして、上記文献1に記載のタンパク質も、請求の範囲1-8に記載の遺伝子によりコードされるタンパク質も、由来は同じホタルであるので、上記文献1に記載のタンパク質に上記周知手段を適用し、コードするDNAを得ることは、当業者が容易になし得たことである。したがって、請求の範囲1~8の発明には、進歩性がない。

請求の範囲9~11について

タンパク質をコードする遺伝子がクローニングされれば、これを含むベクターを作って宿主に導入し、形質転換体を得てタンパク質を生産することは、遺伝子工学分野における常套手段であり、請求の範囲9~11の発明にも、格別な技術的特徴は見いだせない。したがって、請求の範囲9~11の発明にも進歩性がない。

